Al Chiar.mo Prof. Sen.re Pio Foà
rispettoso e devoto omaggio
G. D'Agata
Camerino 6/VI 19..

Prof. Dott. G. D'AGATA

Contributo allo studio isto-bio-chimico sul pigmento dei melanosarcomi

392

Estratto da *Tumori*, Anno VIII, fasc. IV

ROMA
TIPOGRAFIA DEL SENATO
—
1921

Prof. Dott. G. D'AGATA

Contributo allo studio isto-bio-chimico sul pigmento dei melanosarcomi

Estratto da *Tumori*, Anno VIII, fasc. IV

ROMA
TIPOGRAFIA DEL SENATO

1921

ISTITUTO DI PATOLOGIA E CLINICA CHIRURGICA
DELL' UNIVERSITÀ DI CAMERINO

Prof. Dott. G. D'AGATA

Contributo allo studio isto-bio-chimico sul pigmento dei melanosarcomi [1]

Il problema sulla natura e origine del pigmento nei tumori melanotici ha dato luogo a molte discussioni e controversie.

Il dibattito per lungo tempo è stato principalmente imperniato sulla questione della pretesa sua derivazione da trasformazione del pigmento ematico; e per questo si tenevano in gran conto le analisi chimiche e le ricerche sulla presenza o mancanza del ferro.

Così analizzando chimicamente dei tumori melanotici alcuni autori hanno affermato di aver potuto mettere in evidenza una certa percentuale di ferro (analisi di Dressler, Mörner, Lo Cascio, Braude e Pfeiffer, Schmiedeberg); mentre al contrario altri ne escludono la presenza o ne ammettono tracce minime, che vengono attribuite ad impurità e quindi da trascurare nella valutazione dei fatti per ammetterne la genesi dall'ematina (analisi di Heintz, Berdez e Nencky, v. Fürth, Salkowski).

Di pari passo alle sopradette ricerche chimiche sono andate alcune ricerche microscopiche, le quali si proponevano di ricercare il ferro sulle sezioni istologiche, ottenute a mezzo del microtomo congelatore, cimentandole con speciali reazioni, quali il metodo di Perls, di Sneider, e quello di Quincke. Con tale espediente di tecnica hanno ottenuto risultati negativi Carbone, Lagrange, Vallillo, Licini, Pereyra, Razzaboni. È da notare però come alcuni autori, come Neumann, Schmorl e

(1) I preparati istologici sono stati presentati alla Società Eustachiana di Camerino nell'adunanza del 7 dicembre 1921.

v. Kahlden, avevano già espresso il parere sulla poca attendibilità del risultato negativo in queste ricerche per negare l'esistenza del ferro, potendo questo trovarsi nel tessuto in combinazione tale, per cui le reazioni possono non aver luogo.

A questi studi chimici e istologici sulla natura del pigmento dei tumori melanotici, vanno intimamente legati altri studi sull'origine di esso, ammettendo alcuni studiosi che questo abbia origine dall'esterno dell'elemento cellulare, e in esso pervenga per un processo di infiltrazione; mentre una schiera di osservatori è dell'avviso che il pigmento melanico delle cellule neoplastiche abbia origine endogena, e che quindi venga elaborato in sito per una speciale attività cellulare.

Studi moderni tenderebbero sopratutto a precisare l'origine delle melanine delle cellule neoplastiche come derivati da disintegrazione della molecola proteica. A questi risultati hanno moltissimo contribuito una interessante serie di ricerche, comprovanti come le melanine naturali (da considerare probabilmente come simili alle melanine dei tumori melanotici) derivino da ossidazione e condensazione di composti a struttura ciclica delle proteïne (per i corpi melanoidinici vedi ricerche di Ducceschi, di Schmiedeberg; per le melanine naturali, ric. di v. Fuerth, Neuberg, Meirowschy, Samuely, Durham).

Quali corpi ciclici da considerare come melanogeni, per la maggioranza dei sopradetti autori è da attribuire valore a corpi a struttura essenzialmente fenolica, del tipo della tirosina, che trovasi quasi sempre quale costituente delle proteine. Tale sostanza, secondo v. Fürth e Schneider si renderebbe libera per disintegrazione proteica e poi si trasformerebbe in melanina per azione di alcuni fermenti ossidanti, quali la tirosinasi.

Secondo più recenti concetti, basati su numerosi dati di fatto, le melanine avrebbero origine dalla condensazione e ossidazione di nuclei pirrolici, che come è noto, si trovano tanto diffusi in natura, quali costituenti delle proteine. (Vedi lavori di Angeli e Saccardi).

Suggestivi per il nostro argomento sono i risultati comunicati dal Saccardi e dal Rondoni, i quali affermano di aver ottenuto dell'imbrunimento cutaneo (molto evidente a carico dei bulbi piliferi), se si

iniettano ripetutamente sottocute del pirrolo o altri suoi derivati, a conigli, a pelame scuro, specialmente se questi animali vengono tenuti alla luce.

*
* *

Essendo venuto alla mia osservazione in Clinica un caso di melanosarcoma della cute, volli intraprendere delle ricerche isto-bio-chimiche allo scopo di portare un contributo sull'argomento, tenendo presenti le moderne vedute sulla genesi delle melanine da composti pirrolici.

Si trattava di un uomo di 37 anni, che nel gennaio 1917, trovandosi sotto le armi, vide sorgere a carico di un neo pigmentato della cute, situato a livello del malleolo interno, in vicinanza della regione calcaneare sinistra, una neoformazione, che fu diagnosticata come sarcoma melanotico. Ricoverato in un ospedale militare, nel settembre dello stesso anno, fu chirurgicamente asportato il tumore, allorchè esso aveva assunto la grossezza di un uovo di piccione. Afferma di non aver avvertito alcun disturbo, nè di aver notato altra neofermazione, fino al marzo 1918, allorchè si accorse di una tumefazione indolente alla regione inguino-crurale dello stesso lato. Per tale affezione chirurgica chiese ospitalità, nel giugno 1919, alla Clinica chirurgica di Camerino e fu operato dal prof. Razzaboni di asportazione della massa neoplastica, della grandezza di una grossa arancia, dalla regione inguino-crurale, assieme ad altri gangli linfatici della parte, poco invasi dal processo blastomatoso.

Essendo state notate altre tumefazioni nella regione iliaca interna sinistra, fu praticata una toelette della regione, la quale riuscì abbastanza laboriosa, avendo parte della massa neoplastica assunti intimi rapporti con i vasi iliaci.

Il prof. Saccardi procedette a ricerche chimiche su pezzi di tumore (che presentava istologicamente la struttura di un sarcoma polimorfocellulare melanotico), appena escisso operatoriamente, ottenendo delle melanine, che presentavano in generale gli stessi caratteri delle melanine naturali e del nero di pirrolo.

Dopo alcun tempo dal secondo intervento chirurgico, si notò riproduzione in sito della neoplasia nella regione inguino-crurale, con invasione nella regione soprapubica: neoformazioni, poco o nulla macroscopicamente pigmentate, che raggiungendo il volume di una grossa arancia, cominciarono a ulcerarsi. Intanto anche in corrispondenza del malleolo interno, dove era sorta tre anni avanti la prima formazione neoplastica a carattere melanotico (neoplasia chirurgicamente asportata nel settembre 1917), si notò di nuovo la comparsa di una piccola tumefazione, non pigmentata, spostabile sulla pelle soprastante, di colorito normale.

Un'altra tumefazione con gli stessi caratteri si presentò sulla parte antero-esterna della gamba sinistra, nel suo terzo medio.

A questo periodo, ripetutamente esaminate le urine di questo paziente con le diverse reazioni, per svelare la presenza di melanogeno, si ebbe risultato incerto con la reazione col Thormählen e anello lievemente bruno con l'acido nitrico.

Durante la degenza in Clinica volli iniettare in seno alla compagine del nodulo neoplastico, situato del terzo medio della gamba sinistra, c.c. 2 di una soluzione debolmente alcalina di pirrolo all' 1 per cento (gentilmente favoritami dal prof. Saccardi), che ripetei per quattro volte con l'intervallo da tre a quattro giorni. Queste iniezioni riuscirono indolori e non diedero il benchè minimo disturbo, come aveva precedentemente notato il Saccardi. Le urine del paziente analizzate diedero luogo a fugace e debole reazione col Thormählen e formazione di anello bruno con l'Heller, dalla 16ª alla 50ª ora.

Già alcuni giorni dopo dalla seconda iniezione di pirrolo la massa neoplastica pirrolizzata faceva notare attraverso la cute normale un certo imbrunimento, che divenne ulteriormente più intenso; mentre l'altro nodulo della regione malleolare, iniettato con la stessa quantità di soluzione fisiologica, si manteneva non pigmentato. Tre giorni dopo dall'ultima iniezione, escissi il nodulo neoplastico pirrolizzato e quello non pigmentato, sottoponendo all'esame microscopico dei pezzi tagliati al microtomo congelatore e montati in glicerina. In tutt'e due i pezzi era architettonicamente evidente la struttura sarcomatosa, per lo più a cellule poli-

morfe, in alcuni punti a cellule fusate; mentre però quello pirrolizzato mostrava chiaramente la maggior parte delle sue cellule infarcite di granuli di pigmento di color giallo-brunastro o marrone più o meno scuro, quell'altro se ne mostrava sprovvisto o faceva notare nell'interno dei suoi elementi cellulari delle scarse granulazioni, come vescicole di color gialletto. Nel nodulo pigmentato erano riconoscibili a più forte ingrandimento, in mezzo a cellule infarcite talmente da esserne completamente mascherate da granuli di pigmento, delle cellule meno cariche o quasi prive di granulazioni melaniche. Questi ultimi elementi cellulari si presentavano di minor grandezza di quei fortemente pigmentati, mostrando distintamente il loro nucleo.

Da questi esperimenti (che trovano riscontro in quelli sopra ricordati di Saccardi e Rondoni, i quali hanno ottenuto aumento di fabbricazione di melanine da parte di cellule della matrice del pelo, con iniezioni di composti pirrolici nel sottocutaneo di conigli) possiamo affermare che l'iniezione di pirrolo, praticata nella compagine di un nodulo metastatico sarcomatoso, non pigmentato (proveniente da un melanosarcoma cutaneo), è stato capace di provocare, attivando, la formazione di prodotti melanici, da parte di cellule neoplastiche melanogene, ossidazione prodottasi verosimilmente per opera di speciali fermenti (dopa-ossidasi, sec. Bloch, pirrolo-ossidasi, sec. Rondoni).

*
* *

Allo scopo di poter meglio stabilire la natura delle granulazioni di pigmento, rilevate nel parenchima del nodulo neoplastico pirrolizzato, ho voluto sottoporre sezioni di questo a varie reazioni istochimiche, mettendo in confronto tali risultati con quelli ottenuti su sezioni di pezzi di tumore melanotico, estirpato alcuni anni prima e conservato in soluzione di formalina al 10 per cento.

Adoperando su sezioni, ottenute al microtomo congelatore, il metodo di Perls-Scneider per la ricerca del ferro (ferrocianuro di potassio e acido cloridrico) ebbi risultato negativo. Così pure usando il metodo di Unna alla fucsina e differenziazione in acido tannico, per mettere in

evidenza i pigmenti ematici. Col bleu di metilene policromo, invece, raccomandato dallo stesso Unna come reattivo istologico per le melanine, ebbi a notare come le granulazioni di pigmento assumano una tinta verde-smeraldo o verde-erba più o meno scuro; e ciò avveniva tanto nelle sezioni dei pezzi, tratti dal tumore melanotico, quanto nelle sezioni del nodulo divenuto pigmentato in vivo con l'artificio sopraindicato.

*
* *

Avendo precedenti autori (Cipollone, Pereyra, Bilancioni e altri) asserito che col metodo Alfieri, al permanganato di potassio e successiva azione dell'acido ossalico, si riesce a poter decolorare (completamente secondo Pereyra, parzialmente secondo Bilancioni) le granulazioni di pigmento, riscontrato in vari tumori melanotici dell'uomo, volli provare tale modalità di tecnica per decolorare sezioni istologiche, tagliate al microtomo congelatore, tanto di pezzi di tumore naturalmente melanotico, quanto del nodulo metastatico, divenuto pigmentato con ripetute iniezioni di pirrolo. Facendo agire il permanganato di potassio per 5'-10' ottenni la decolorazione di quasi tutte le granulazioni di pigmento, dal color giallo al giallo-brunastro e marrone scuro; tranne di alcune poche granulazioni nere, che trovavansi nell'interno degli elementi cellulari del tumore originariamente melanotico.

Per controllo volli sottoporre all'azione del permanganato di potassio e acido ossalico, per lo stesso lasso di tempo, delle sezioni di pelle di coniglio, a pelame scuro, i cui peli erano ricresciuti neri dopo ripetute iniezioni in loco di composti pirrolici.

Ho notato che mentre le parti pigmentate in giallo-brunastro, come quelle della parte esterna della guaina del pelo subivano l'azione decolorante dei reagenti adoperati, le parti colorate intensamente in nero, quali il bulbo pilifero e gli scapi del pelo, non mostravano alcuna riduzione della loro intensa pigmentazione. Rilievo anche messo in evidenza per i pigmenti nerissimi della coroide di vitello, che si decolorano solo se la soluzione di permanganato di potassio si fa agire per lungo tempo (da mezz'ora a parecchie ore, a seconda l'intensità di colorazione dei granuli di pigmento).

È probabile che i neri intensi rappresentino l'ultimo grado del ciclo delle melanine, mentre le granulazioni colorate in giallo, marrone chiaro o brunastro (messi in evidenza nell'interno degli elementi cellulari neoplastici, che si decolorano facilmente col metodo Alfieri e che assumono un colorito verde-smeraldo col bleu di metilene policromo di Unna) rappresentino gradi di passaggio, necessariamente e successivamente ascendenti per giungere al nero, colore che poi si riscontra intensissimo nella coroidea o in altre melanine naturali; neri non agevolmente isolabili, nè facilmente solubili.

Intanto, colorando le sopradette sezioni di cute di coniglio a pelame scuro (senza essere stati sottoposti all'azione del decolorante), ho notato come la parte della guaina del pelo, pigmentata in giallo-brunastro assume col bleu policromo un colorito verde-smeraldo, mentre il bulbo pilifero e gli scapi del pelo rimangono intensamente neri. Se le sezioni di cute di coniglio a pelame scuro, invece, dopo aver subito per 5′-10′ l'azione del permanganato di potassio e acido ossalico, vengono sottoposte alla colorazione col bleu policromo di Unna, si rileva - al posto del color verde-smeraldo, precedentemente notato - una colorazione azzurra più o meno intensa. Fatto pure nettamente notato nelle sezioni del nodulo sarcomatoso umano apigmentato e del tumore melanotico, dello stesso individuo, decolorato in 5′-10′ col metodo Alfieri e dove rimanevano visibili nell'interno degli elementi cellulari (in sezioni, tagliate al microtomo congelatore e montate in glicerina) dei vacuoli, colorati molto debolmente in giallo.

Tutti questi fatti porterebbero ancor più ad orientarci nel senso, che le granulazioni di colorito giallo o marrone più o meno brunastro, riscontrate tanto nel nodulo sarcomatoso naturalmente melanotico, quanto in quello reso pigmentato in vivo con ripetute iniezioni di pirrolo in loco, rappresentino con probabilità termini di ossidazione di composti pirrolici, tendenti ad aumentare l'intensità della loro colorazione fino a pervenire al nero, che si riscontra nelle melanine naturali; sostanze intermedie che somiglierebbero a quelli che Angeli cita come prodotti secondari, ottenuti ossidando composti pirrolici, per mezzo dell'acido peracetico.

*
* *

I risultati riportati in questa nota ci inducono a credere che il pigmento posto in evidenza nell'interno degli elementi cellulari del tumore melanotico provenga da stadi successivi di trasformazione di prodotti pirrolici in circolo (ossidazione probabilmente prodottasi per opera di speciali fermenti) e quindi da stati successivamente più colorati dal giallo al marrone-scuro o bruno-intenso, giacchè non solo ho potuto seguire microscopicamente nelle sezioni istologiche del tumore questi termini di trasformazione, ma ho visto anche che i prodotti ultimi di queste melanine - a differenza dei suddetti prodotti intermedi - non reagiscono, come questi, al bleu di metilene policromo di Unna, nè si scolorano facilmente col metodo Alfieri.

Che per la formazione di tali melanine concorrano dei composti pirrolici sta a dimostrarlo il fatto che il nodulo metastatico apigmentato si è lestamente caricato di pigmento melanico dopo iniezioni di pirrolo; che se invece questi fosse rimasto estraneo o inerte la pigmentazione del nodulo metastatico non sarebbe forse avvenuta o avrebbe seguito la sua normale, progressiva e lenta evoluzione.

Le surriportate ricerche isto-bio-chimiche illustrano con dati di fatto, quanto hanno già stabilito fondamentali studi, specialmente della scuola italiana sulle melanine in genere (Angeli e Saccardi dal lato chimico, Rondoni dal lato biologico, Gallerani dal lato fisico), facendo rilevare quale e quanta parte importante spetti al nucleo pirrolico anche nella formazione del pigmento dei tumori melanotici.

BIBLIOGRAFIA

ANGELI, Gazzetta chimica ital. anno XLVI parte II, fasc. IV, 1916. Rendiconti d. R. Accad. dei Lincei vol. XXIV, 2°, 1915; vol. XXVII, fasc. 6, 1918; vol. XXVII, serie 5, fasc. 7, 1918.

ANGELI e ALESSANDRI, Gazzetta chimica ital. anno XLVI, parte II, fasc. IV, 1916.

ANGELI e LUTRI, Rendiconti R. Accad. dei Lincei, vol. XXIX, serie 5, fasc. I–II, 1920.

ANGELI e PIERONI, Rendiconti R. Accad. dei Lincei, vol. XXVII, fasc. 10, 1918; vol. XXX, serie 5, fasc. 8, 1921.

ALFIERI, (vedi metodo di decolorazione del pigmento melanico); Fusari, Tecnica istologica. Union. tip. Torinese 1919, p. 48; Schmorl, Tecn. istol. Un. tipografica Tor. 1911, p. 150.

BASILE, *Sulla composizione e origine dei pigmenti nei melanosarcomi.* Tommasi, N. 30, 1906.

BÉCHAUX, *Contribution à l'étude du sarcome mélanique.* Thèse de Paris, 1908-09.

BERDEZ u. NENCKY, *Ueber die Farbstoffe der melanotischen Sarkome.* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. Bd. XX.

BILANCIONI, *Sarcoma melanotico della fossa nasale.* Tumori, anno VII, fasc. I, 1921.

BLOCH, Zeitschrift f. physik. Chemie. Bd. XCIII, 1917; Arch. f. derm. u. syphilis. Bd. CXXIV, Hf. 2, 1917.

BONNET, *La mélanose et les tumeurs mélanotiques.* Thèse de Lyon, 1911. Lyon chirurgical T. VIII, 1912.

CARBONE, *Contributo alla conoscenza chimica dei pigmenti dei melanosarcomi.* Giornale d. R. Accad. med. di Torino, N. 7–8, 1896.

CIPOLLONE, *Sulla struttura di alcuni sarcomi melanotici.* Ann. di med. navale II, 1896.

DRESSLER, Vierteljahrschrift f. prat. Heilk. Bd. 88, 1865.

DUCCESCHI, *Sulle melanine.* Archivio di fisiologia, vol. I, 1904.

DURHAM FLORENCE. Proceed. R. Society, LXXIV, 1914.

EPPINGER, Biochem. Zeitschr. Bd. XXVIII, 1910.

v. FUERTH, *Probleme d. physiolog. u. pathol. Chemie.* Leipzig, 1913.

GALLERANI, *Ricerche spettro-fotometriche sul pirrolo e le melanine.* Boll. Soc. Eustachiana di Camerino, 7 dic. 1921.

GASKILL H. K. *Melanotic sarcomas resulting from irritation of the pigmented nevi* Journ. Americ. Med. Assoc. 1913.

HAVA, *Zur Kenntnis der Melanome.* Virchow's Archiv. Bd. 215, 1914.

HEINTZ, (rip. da Lo Cascio p. 3).

JÄGER, *Die Entshehung des Melaninfarbstoffes.* Virchow's Archiv. Bd. 198.

LAGRANGE, Bull. Soc. Anat. et phys. de Bordeaux, 1891.

LICINI, *Contributo allo studio dei tumori melanotici.* Riforma medica, N. 24, 1911.

Lo Casciq, *Sulla costituzione del pigmento dei sarcomi melanotici della coroide.* Roma, Tip. Artero, 1915.

Meirowsky, *Frankfurter Zeitschrift f. Pathol.* Bd. 2, 1909. Centralblatt f. allg. Pathol. Bd. XX, 1909.

Mörner, Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. II, p. 66.

Neuberg, *Festschrift f. Salkowski.* Berlin 1904; Bioch. Zeitschr. Bd. VIII, 1908; Virchow's Archiv. Bd. 192, 1908.

Nevpeau, Mémoires de la Société de biolog. T. XXIV, 1872.

Pereyra, *Contr. allo studio dei melanosarcomi epibulbari.* Annali di oftalmologia, fasc. 11-12, 1913.

Pighini, *Sul comportam. del pirrolo nell'organismo animale.* Archivio di fisiologia, vol. III, fasc. I, 1905.

Primavera, *Contributo allo studio del pigmento dei melanosarcomi.* Giorn. intern. delle scienze mediche, fasc. 20, 1907.

Razzaboni, *Sarcoma melanotico primitivo del masc. sup.* Lo sperimentale, fasc. 5, 1915.

Ravenna, *Beiträge z. Histogenese der melanotischen Geschwülste.* Virchow's Archiv. Bd. 171, 1903.

Ribbert, *Ueber das Melanosarcom.* Ziegler's Beitrag. Bd. XXI, 1897.

Rondoni, *Sulle origini delle melanine dal pirrolo.* Lo sperimentale, fasc. 4-6, 1920, fasc. 1-3, 1921; Riforma medica, N. 35, 1921.

Rössle, *Pigmentierungsorgang im Melanosarkom. Zeitschr. f. Krebsforschung.* Bd. II, 1904.

Saccardi, *Pirrolo e melanuria.* Nota I in Rendic. R. Accad. dei Lincei XXVIII, 1, 1919; Nota II, ibid. XXVIII, 2, 1919; Nota III, Gazzetta Chim. ital. II, 3; Nota IV ibid. 1921; Nota V Rend. R. Accad. dei Lincei e Boll. Soc. Eustachiana di Camerino XIX, N. I, 1921; Nota VI Rend. R. Accad. dei Lincei, 1921; Nota VII Boll. Soc. Eust. di Camerino, N. II, 1921; Nota VII Boll. Soc. Eust. di Camerino, N. III, 1921.

Salkowski, Virchow's Arch. Bd. 227, 1920; Bd. 228, 1920.

Samuely, Hofmeister's Beitr. Bd. II, 1902 e il cap. Tierische Pigmente nell'«Handb. d. bioch. Arbeitsmethoden» di Abderhalden.

Schmiedeberg, (citato da Bilancioni pag. 31).

Unna, (vedi proc. tecn. per la coloraz. dei pigmenti ematici e per le melanine: Schmorl, metodi di esame delle ricerche isto-patolog. - Unione tip. Torinese, 1911, pag. 150.

Stein, *Ueber die Pigmentierung der melanotischen Geschwülste.* Wien. med. Wochenschrift., 1913.

Valerio, *Ricerche istol. su tre casi di melanosarcomatosi.* Giorn. med. del R. Esercito, 1905.

Vallillo, *Ricerche chimiche su un sarcoma melanotico.* Sperimentale, 1909.